-4

342

ARCHIVIO

PER LE

SCIENZE MEDICHE

PUBBLICATO DA

G. BIZZOZERO (Torino) — C. BOZZOLO (Torino) — P. FOÀ (Torino)
C. GIACOMINI (Torino) — C. GOLGI (Pavia) — L. GRIFFINI (Genova)
N. MANFREDI (Pisa) — E. MARCHIAFAVA (Roma) — A. MOSSO (Torino)
L. PAGLIANI (Roma) — E. PERRONCITO (Torino) — E. SERTOLI (Milano)
C. TARUFFI (Bologna) — G. TIZZONI (Bologna)

E DIRETTO DA

G. BIZZOZERO

Tenna

Estratto

TORINO E PALERMO
CARLO CLAUSEN

FIRENZE - ERMANNO LOESCHER - ROMA

1893

ARCHIVIO PER LE SCIENZE MEDICHE — Vol. XVIII. N. 7.

Istituto di Patologia generale dell'Università di Torino.

DI ALCUNE
REAZIONI COLORANTI DELLO SPUTO NELLE MALATTIE

DISSERTAZIONE DI LAUREA

DI

Costanzo ZENONI

Già da parecchio tempo varî autori (Flemming (1), Schifferdecker, Hoyer, ecc.) avevano accennato al fatto, che la sostanza mucosa si colora intensamente con alcuni colori di anilina, e Bizzozero (2) nei suoi studî sulle ghiandole tubulari dell'intestino aveva attirata l'attenzione sull'importanza diagnostica, che pel muco può avere una soluzione concentrata di safranina (vedi anche Paneth (3), Kosinski (4)). Egli ha notato come nelle sezioni indurite nell'alcool o nell'acido picrico le cellule mucipare presentano il loro blocco mucoso colorato in giallo dalla safranina, mentre il nucleo e altre parti del contenuto cellulare restano tinti in rosso o in rosso-giallo di diverso tono. Se per tali colorazioni si dànno

(1) Flemming, *Zeit. f. wiss. Mikr.* 1885.
(2) Bizzozero, « Sulle ghiandole tubulari del tubo gastro enterico » (*Atti della R. Accademia delle Scienze di Torino*, 1888, 1892, 1893).
(3) Paneth, *Centralbl. f. Physiol.*, p. 255 e *Arch. f. mikr. Anat.*, vol. XXXI, pag. 178, 1888.
(4) Kosinski, *Gazeta Lekarska*, n. 38, Varsavie, 1892.

delle differenze, queste trovano una spiegazione nel fatto che vi sono diverse sostanze mucose, nè infirmano l'azione elettiva e caratteristica della safranina per il muco. In base alla specificità di questa reazione io ho intrapreso una serie di ricerche nello scopo di trarne un'applicazione all'esame chimico del secreto delle vie respiratorie.

Un metodo indirizzato a tale analisi è quello recentemente proposto da A. Schmidt (1), il quale ha notato che la miscela tricolore di Biondi imparte alla mucina (come pure alla condrina delle cartilagini) una costante colorazione verde-azzurro, e ritiene questa reazione (meglio che con la Thionina di Hoyer ed altri mezzi coloranti) come specifica del muco. Egli segue questo processo: Sfiocca lo sputo entro una provetta agitandolo con una soluzione alcoolica di $HgCl_2$ al 2,5 %; lo decanta e sostituisce al liquido versato via dell'acqua distillata e due goccie della miscela tricolore di Biondi; dopo 3′-6′ versa di nuovo il liquido e aggiunge al sedimento acqua distillata. Dall'esame di tutte le varietà di sputo venne a stabilire, che lo sputo mucoso dà una reazione verde-azzurro, quello pneumonico una rossa, e fra queste due stanno delle gradazioni violaceo-grigiastre per gli sputi misti, purulenti, emorragici, ecc.

Schmidt ritiene che la differente colorazione impartita dalla miscela tricolore è riferibile alla diversa composizione chimica della sostanza fondamentale, che nello sputo pneumonico è prevalentemente albumina, nel bronchitico invece muco. Egli però osserva come le due colorazioni di contrasto (rosso per l'albumina, verde-azzurro per la mucina) sono influenzate, oltre che dai rapporti in cui possono trovarsi commiste le due sostanze, anche dalla quantità di elementi morfologici presenti, come anche dalla qualità della reazione chimica degli sputi e della miscela tricolora. Conforme dunque a queste considerazioni va giudicata la miscela tricolore, che

---

(1) A. Schmidt, « Ueber Farbenreactionen des Sputums » (*Berliner Klin. Wochensch.* 1893, n. 10).

Schmidt dichiara il migliore e l'unico colore che permette di riconoscere differenze macroscopiche nella colorazione dello sputo.

Io ho ripetuto le prove secondo il metodo riferito, e in generale posso confermarne l'esattezza, quantunque certe sfumature e mezze tinte mi sembrano riferibili piuttosto alla densità varia dei fiocchetti precipitati, che non a lievi differenze nella composizione dei medesimi. Difatti non tutti gli sputi sono egualmente frammentabili: così lo sputo mucoso coagulato con la soluzione alcoolica di $HgCl_2$ si riduce in frammenti meno densi di quelli dello sputo pneumonico. Inoltre, come ha notato anche Posner (1), la presenza di globuli rossi nello sputo esercita un'influenza sulla colorazione fondamentale. Ma i più gravi appunti stanno per il metodo stesso della reazione *in vitro*, che tiene soltanto calcolo della sostanza fondamentale, trascurando la parte dovuta agli elementi cellulari contenuti nello sputo.

Ond'è che io mi determinai ad usare la safranina in luogo della miscela tricolore e ad eleggere un processo diverso da quello di Schmidt. Esso a maggiore semplicità ed esattezza accoppia il vantaggio dell'osservazione non solo macroscopica, ma anche microscopica.

Con due aghi da dilacerazione distendo un frammento di sputo in strato possibilmente uniforme e sottile sopra un vetrino coproggetti, che poi immergo in alcool comune o assoluto. La coagulazione per disidratazione compare tosto con un opacamento. Tolgo il vetrino dopo un quarto d'ora o maggior tempo dopo e lo metto a galleggiare con lo strato di sputo rivolto in giù sopra una soluzione acquosa di safranina di media concentrazione in un vetrino d'orologio. Volendo, può bastare il disporre due o tre goccie del liquido colorante sopra un portoggetti per collocarvi direttamente il preparato, ed in questo caso è bene, affinchè la reazione si faccia presto, far

---

(1) Posner, « Farbenanalytische Untersuchungen » (*Zwölfter Congress für Innere Medicin*, 1893).

spostare il reagente sotto il vetrino mediante leggieri movimenti di inclinazione. Può servire anche il semplice essiccamento all'aria o alla stufa, ma è sempre preferibile l'alcool, perchè di azione facile, fissa molto bene gli elementi dello sputo senza alterarli, rende la colorazione più pronta e spiccata, permette infine di conservare per un certo tempo i preparati inchiudendoli in una soluzione acquosa concentrata di zucchero candito.

Prima di osservare il preparato al microscopio, lo si esamini per trasparenza su fondo bianco.

Se lo sputo è prevalentemente mucoso, come ad es. quello faringo-tracheale e il muco nasale di individui normali, compare tosto una colorazione gialla di tutto il preparato. Questa può essere persistente e talora aumentare, oppure scemare dopo il primo contatto per passare ad una tinta rossastra. Tale fatto si può spiegare considerando: 1° che l'affinità della safranina per il muco si manifesta con la prontezza di una vera reazione chimica, come è già stato notato da Bouma (1) rispetto alla condromucina delle cartilagini; 2° che il protoplasma degli elementi cellulari acquista un colore rosso-fucsina gradatamente, e che quindi, se lo sputo è molto ricco di epitelii, siano questi pavimentosi, cilindrici o alveolari, essi si colorano man mano in rosso. La sostanza mucosa però anche in questi casi è sempre rilevabile al microscopio disposta in ammassi o in strie di color giallo.

Sperimentando invece con sputi pneumonici di 17 casi diversi ottenni quasi sempre una colorazione rossa macroscopicamente manifesta. Devo però aggiungere: 1° può trovarsi mescolata qualche traccia di giallo, ma si può riferire al triplice stadio dello sputo pneumonico (2), come anche alla bronchite, che va generalmente compagna alle polmoniti catarrali; 2° la safranina colora i globuli rossi in aranciato, ma, se lo sputo è schiettamente pneumonico, non ne resta influenzata

---

(1) Bouma, *Centralb. f. med. Wiss.*, 1883, pag. 866.
(2) Lenhartz, « Microscopie und Chemie », 1893.

la colorazione rossa fondamentale; 3° l'abbondanza degli elementi cellulari o la densità della massa mucosa può ostacolare la pronta azione del reattivo, così da aversi un risultato soltanto dopo qualche ora. Ciò riguarda specialmente gli sputi purulenti e quelli ricchi di fibrina, la quale si tinge in rosso carico col prolungato trattamento, mentre si riesce a dimostrare anche scarse quantità di muco.

Quanto al reagente noto che la sua bontà è di capitale importanza per la valutazione del metodo, perchè non tutte le safranine del commercio sono egualmente sensibili (Bizzozero) e i migliori risultati li ottenni con quella della fabbrica Bindschedler e Busch di Basilea.

Circa l'influenza del grado di acidità mi risulta che lo sputo dev'essere di reazione non acida, perchè uno sputo mucoso si colora in rosso, se prima della safranina viene trattato con acido acetico, e perde la colorazione gialla, se viene successivamente acidificato. Pare però che la questione dell'acidità sia limitata alle modificazioni che l'acido acetico determina sul muco, perchè il muco gastrico, quantunque fortemente acido, si colora in un bel giallo, quando venga trattato con la safranina.

Non diversamente che per la miscela tricolore, credo di poter ammettere per la safranina l'interpretazione data da Schmidt intorno alla diversa colorazione, che, rispetto alle due sostanze fondamentali, assumono gli sputi bronchitico e pneumonico. Sapendosi per i lavori di Renk, Kossel, Maxner, Starkow, Müller, Jaksch, Devoto (1), che gli sputi pneumonici, sierosi e purulenti contengono albuminoidi in quantità varie, ho preparato diversi vetrini con siero di sangue, fibrina, albumina d'uovo, albumina del sangue di Trommsdorff, di Suchardt, peptone puro artificiale, e per tutti ottenni della safranina una colorazione rossa. Trattando invece il succo filante espresso da una ghiandola sottomascellare di bue ottenni una tinta giallastra; un giallo brillante ebbi dall'umore vi-

(1) *Archivio italiano di Clinica medica*, 1889.

schioso di un polipo nasale, come anche dal catarro gastrico e dall'utero vaginale. A conferma inoltre della proprietà colorante differenziale della safranina verso le due sostanze albuminosa e mucosa, riferisco ancora queste due prove: 1° mescolai una porzione di sputo pneumonico, che mi dava la reazione rossa, con un'altra di sputo mucoso e col miscuglio preparai dei vetrini: ottenni traccie di giallo, mentre prima erano mancanti. 2° trattando a lungo delle spirali di Leyden, il filamento centrale fibrinoso si è colorato in rossigno e il mantello mucoso periferico in aranciato. Questa differenziazione ottenuta con la safranina, fu notata anche da Schmidt con la miscela tricolore: essa acquista valore di fronte all'opinione di Gerlach (1), secondo cui il filamento centrale delle spirali non sarebbe una formazione diversa dal mantello, ma soltanto l'impressione ottica di una maggiore compattezza.

Ho voluto provare la reazione della safranina con altri liquidi dell'organismo contenenti sostanza mucosa (2), e i risultati ottenuti mi permettono di ritenere che la safranina può presentare la colorazione gialla, all'infuori della mucina, con alcune sostanze che sembrano mucogene o affini alla mucina. Osservai la metacromasia in diversi preparati fatti con la sinovia del ginocchio, col liquor folliculi di un ovaio di giovenca, nonchè con la membrana amniotica, col calazon e la membrana vitellina dell'uovo di gallina, con cartilagine fetale.

Ho posto a raffronto alle colorazioni ottenute il trattamento dell'acido acetico, ed ho motivo per credere che quest'ultimo non è forse così sensibile come la safranina verso la sostanza mucosa. Difatti talora, mentre con l'acido acetico non osservavo che un lieve intorbidamento, con la safranina invece compariva la reazione gialla; questa però era meno spiccata di quella offerta dal vero muco. Si dovrà inferirne una imperfezione di metodo in meno per l'acido acetico o in più per la safranina? Bizzozero non crede che ci sia nessuna

---

(1) *Deutsch. Arch. f. Klin. Med.*, 51.
(2) Oscar Israel, « Traité pratique d'Histologie pathologique ».

reazione, neppure quella dell'acido acetico, che sia necessaria ed esclusiva delle sostanze mucose. Difatti le cellule delle ghiandole coliche, nonchè il muco dello stomaco (Heidenhain) impallidiscono all'acido acetico; invece con la safranina assumono egualmente la colorazione gialla. Inoltre egli ha osservato rispetto alle cellule mucipare dell'intestino, per il muco giovane un color giallo-castagno, per l'adulto giallo-zolfo. Ora, essendo noto che nel liquor folliculi è contenuta la paralbumina di Waldeyer, albuminoide che va compreso con la metalbumina di Hammarsten (1) sotto la denominazione di pseudomucina (2), sostanza affine alla mucina, credo di poter riferire a questa sostanza il colorarsi metacromicamente del liquor folliculi, interpretando inoltre la sostanza fondamentale come mucina giovane in base al tono giallo assunto meno spiccato di quello del vero muco. La stessa interpretazione potrebbe stare per ragioni di somiglianza anche per il calazon, la membrana vitellina, l'amnios. Quanto alla sinovia mi riporto al parere di Salkowsky (3), il quale ha chimicamente dimostrato che la *sinovina* è una mucina abnorme come quella della bile.

Nell'ultima parte del suo lavoro Schmidt tratta del significato pratico delle reazioni coloranti date dalla miscela triacida e quale valore diagnostico spetti ad esse. Egli osserva come clinicamente si diano dei casi, in cui torna difficile decidere se trattasi di polmonite o di pleurite. Difatti talora lo sputo pneumonico può mancare del colorito rossigno; inoltre si dànno casi di bronchite (specialmente nei vizî di cuore), di infarto emorragico, ma anche nella bronchite acuta emorragica, in cui lo sputo è denso e rossastro. Di più i coaguli di fibrina possono mancare nella polmonite come esservi nella semplice bronchite. Tali casi possono essere legati con pleurite essudativa e l'esame fisico dello sputo non potrà dare

---

(1) Hammarsten, *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 6, 1882.
(2) Pfannenstiel, « Ueber die Pseudomucine der cystischen Ovariengeschwülste » (*Arch. f. Gynäk.* Bd. XXXVIII, Heft 3).
(3) Salkowsky, *Virch. Arch.*, 131/2.

nessuna conclusione. Ora, secondo Schmidt, la reazione colorante dello sputo avrebbe in tali casi un valore diagnostico; perchè, se si tratta di sputo vischioso, filante che si colora in rosso, esso è povero di mucina e con probabilità proviene dagli alveoli; quando invece il secreto dei bronchi è specialmente filamentoso (e non fluido come talora nel catarro acuto) contiene sempre molto muco e dà una tinta verde-azzurro. Riferisce di un caso nella clinica di Gerhardt, in cui era dubbia la diagnosi di polmonite o di pleurite essudativa; ma poi l'insorgere di empiema richiese la toracotomia. Orbene fin dal primo giorno lo sputo aveva sempre presentato una tinta violetto-grigia, e mai rossa.

Davanti a questo unico caso non credo che il pratico possa attendersi dal metodo di Schmidt un sussidio diagnostico; d'altronde l'autore stesso dichiara d'aver riferito questo caso solo per il desiderio che venga sperimentata da altri la miscela tricolore. Posner (1) ne fece applicazione non solo all'esame degli sputi, ma anche di essudati, di sedimenti urinosi, ecc., confermando in generale il significato chimico della reazione. Io ho notato le due colorazioni differenziali che assumono lo sputo pneumonico e quello bronchitico quando vengano trattati tanto con la miscela tricolore come con la soluzione di safranina, ma devo dichiarare che l'impiego di quest'ultima fornisce dei dati più sicuri. La reazione macroscopica non può aver diritto alla precedenza sull'osservazione microscopica, perchè un'influenza troppo grande spetta agli elementi commisti alla sostanza fondamentale dello sputo. Inoltre sono molti i dati importanti che al clinico interessa di conoscere nell'espettorato, e quindi oltre alla reazione colorante si renderà sempre necessaria l'osservazione microscopica. È appunto per questa considerazione che il metodo della safranina merita a mio giudizio la preferenza. La reazione nella provetta non può svelare piccole quantità di muco, mentre, colorando i preparati di sputo con la safranina, si possono

(1) V. loco cit.

sempre riconoscere al microscopio, sia sotto forma jalina che fibrillare o granulosa. La reazione *in vitro* presenta una causa d'errore quando vi siano molte cellule nello sputo, e il difetto più grave è che quando sovrabbondano i leucociti predomina il colore rosso di questi. D'altra parte il metodo di preparazione dei vetrini torna poi utile e comodo anche per l'esame di liquidi patologici, sedimenti urinarî, vomiti, feci, ecc.; e credo riserbato un utile impiego alle reazioni coloranti nei casi in cui si hanno sputi con colorazione abnorme o accidentale.

Riassumendo, dalle mie ricerche sugli sputi risulta: — Il metodo della safranina è assai utile nella diagnosi differenziale fra lo sputo pneumonico e i varî sputi bronchiali. Esso è preferibile al metodo di Schmidt, perchè, essendo interamente istituito su preparati microscopici, la dimostrazione della reazione della sostanza fondamentale (muco, albumina od altro) riesce spiccata anche quando la presenza di una grande quantità di elementi cellulari (epitelî o leucociti) tenderebbe, quando si facesse il suo esame macroscopico, a mascherare.

Chiudo il presente lavoro indirizzando al Prof. Bizzozero, direttore del Laboratorio di Istologia e Patologia generale, i miei sentiti ringraziamenti.

Torino, Luglio 1893.
